

## 明細書

## 筋緊張亢進性疾患の治療剤

背景技術

5 本発明は、A型ボツリヌス毒素のM体を有効成分とする筋緊張亢進に起因する疾患の治療剤に関し、特に斜視、眼瞼痙攣、片側顔面痙攣、痙性斜頸、脳卒中後の麻痺、小児脳性麻痺、痙性発声障害、頭痛、腰痛、頸痛、背中痛、肩こり、パーキンソン病若しくは多発性硬化症に伴う筋弛緩不全、筋膜痛症候群、咀嚼筋痙攣、慢性裂肛、尿失禁、歯ぎしり、顔面ミオキミア、チック、局所性ジストニー、皺などの治療剤に関する。

技術分野

ボツリヌス菌は、偏性嫌気性のグラム陽性桿菌であり、ボツリヌス菌によって產生される毒素は末梢神経終末部に高い親和性を有し、全身骨格筋の弛緩性麻痺  
15 を主症状とするボツリヌス中毒症を惹き起こすことが知られている。

ボツリヌス菌が產生する毒素は、抗原性の違いによりA～Gまでの7つに分類され、さらに神経毒素に結合する無毒性タンパク質の構造の相違によってM体、L体およびLL体に分けることができる。特開2003-9897号公報には、M体、L体およびLL体を含むボツリヌス毒素の液を、ラクトースカラムに通  
20 すことによって血球凝集活性を示さないM体(hemagglutinin陰性体：HA陰性体)と血球凝集活性を示すL体およびLL体(hemagglutinin陽性体：HA陽性体)に分離できることが記載されている。

A型ボツリヌス毒素には、神経毒素に血球凝集活性を示さない無毒成分が結合した分子量約30万のM体(HA陰性体)、M体に血球凝集活性を示す無毒成分が結合した分子量約50万のL体(HA陽性体)および2つのL体が会合した分子量約90万のLL体(HA陽性体)の三種類が存在することが知られている。

ところで、斜視は拮抗筋間の緊張バランスが破綻することによって生じ、眼瞼痙攣は眼輪筋の不随意収縮により開眼が困難になる病態である。顔面痙攣は顔面

神経の被刺激性亢進により顔面筋が不随意に収縮する疾患であり、また、痙性斜頸は頭頸部の筋緊張異常により頭位に異常を来たす病態である。咀嚼筋攣縮は下頸に不随意運動を生じる病態であり、両側性に下頸を引き上げる（口を閉じる）運動が不随意に生じる。歯ぎしりは咀嚼筋攣縮と類似の症状を示し、睡眠中の現象で一種の睡眠障害と考えられている。痙性発声障害は、声帯の運動筋に不随意収縮を生じ、正常の発声ができなくなる病態であり、顔面ミオキミアにおいては、一部の顔面の筋束に筋線維束攣縮が群発し、皮膚や粘膜表面に揺れるような、あるいは、うねるような持続性の不随意運動が観察される。チックはトゥレット症候群とも呼ばれ、痙攣性、電撃的、突発的に生じる筋攣縮が生じる病態であり、その例としては、瞬目、顔しかめ、首振り、叫び声などが挙げられる。慢性裂肛は、裂肛が繰り返し起こることにより肛門括約筋の過緊張を伴い、肛門の弾力性が失われて肛門狭窄を生じる病態である。切迫性の尿失禁においては、膀胱の一部の筋肉が不随意に過度に緊張することにより強い尿意を感じやすくなり、意思とは無関係に排尿してしまう病態である。筋膜痛症候群は、急性の筋肉の障害や筋肉の反復性の過負荷ストレス（使いすぎ）により、筋肉内に硬いしこりのような部分（緊張帯）ができ、強い痛みを感じる疾患であり、脳卒中後、あるいは、小児性脳性麻痺、パーキンソン病若しくは多発性硬化症の発症に伴い、手や足の筋緊張が過度に亢進することが知られている。さらに、首や肩の筋肉の緊張が異常に亢進することによって慢性的に片頭痛などの頭痛を生じ、また、筋肉の使いすぎや持続的な不良姿勢により筋肉の緊張が異常に亢進し、結果的に、腰痛、頸痛あるいは背中痛などの慢性的な疼痛や肩こりが誘発されることも知られている。皺は、筋肉の収縮により生じ、顔面の皺としては、例えば眉間の皺、目尻の皺、鼻根部の皺などがある。このように、斜視、眼瞼痙攣、顔面痙攣、痙性斜頸、脳卒中後の麻痺、小児脳性麻痺、痙性発声障害、片頭痛などの頭痛、腰痛などの慢性的な疼痛、肩こり、パーキンソン病や多発性硬化症などの発症時に起こる筋弛緩不全、筋膜痛症候群、咀嚼筋攣縮、慢性裂肛、尿失禁、歯ぎしり、顔面ミオキミア、チック、局所性ジストニー、皺などは、いずれも局所性の筋緊張亢進作用が原因となっている。

ボツリヌス毒素を筋緊張亢進に起因する疾患の治療に利用するものとしては、例えば、Ophthalmology, 87, 1044-1049(1980)ではボツリヌス毒素が斜視の治療に用いられ、また、J. Fr. Ophthalmol., 13, 259-264(1990)では眼瞼痙攣の治療に用いられている。特表平8-511536号公報には、ボツリヌス毒素を臨床的応答の低下が生じるまで投与し、その後に、他のボツリヌス毒素を投与して神経筋疾患を処置する方法が開示されている。特表平8-511537号公報には、A～G型のボツリヌス毒素のうちの少なくとも2種を組み合わせて投与することにより神経筋疾患を処置する方法が開示されている。Therapy with botulinum toxin, Marcel Dekker, New York, 1994, p. 577-595には、ボツリヌス毒素が眉間の皺の治療に有効であることが報告されている。

実際に、眼瞼痙攣、片側顔面痙攣、痙性斜頸または皺などの治療に有効なボツリヌス毒素として、ボツリヌス毒素のL型体を有効成分とするBOTOX（登録商標）（アラガン社製）が販売されている。

しかしながら、上記いずれの文献にも、A型ボツリヌス毒素のM型（HA陰性体）を斜視、眼瞼痙攣、皺などの筋緊張亢進に起因する疾患の治療に適用することは、全く記載されておらず、示唆もされていない。

#### 発明の開示

ボツリヌス毒素は、筋緊張を緩和する薬物として知られているが、それ自体毒性の強い薬物である。したがって、ボツリヌス毒素は、その副作用として筋緊張緩和による全身倦怠感などを来すことがあり、とりわけ、使用量を誤ると重篤な副作用を来すので、ボツリヌス毒素の投与量を可能な限り少なくすることが望まれている。また、ボツリヌス毒素を繰り返し投与することにより、その有効性が減弱していくという問題点が指摘されており、この現象は毒素に対する抗体産生に依存していると考えられている。したがって、抗体産生を誘導せず、繰り返し投与しても効果が減弱しない治療剤が求められている。既にボツリヌス毒素のL型体を有効成分とするBOTOX（登録商標）が販売されているが、効果や副作用の観点から、より優れた製品の開発が待たれている。

本発明者らは、A型ボツリヌス毒素の構成成分（M体、L体、LL体）に着目して銳意研究を重ねた結果、神経毒素に血球凝集活性を示さない無毒成分が結合した分子量約30万のM体（HA陰性体）は、M体に血球凝集活性を示す無毒成5 分が結合した分子量約50万のL体および分子量約90万のLL体の混合物（HA陽性体）よりも優れた神経筋伝達阻害活性を有し、また、市販のBOTOX（登録商標）の5倍もの治療指数を有し、さらに、抗体を産生しにくく、繰り返し投与しても効果を維持できるので、A型ボツリヌス毒素のM体は筋緊張亢進に起因する種々の疾患の治療剤として特に有用であることを見出し、本発明を完成す10 るに至った。

本発明は、A型ボツリヌス毒素のM体（HA陰性体）を有効成分とする神経筋伝達阻害剤、すなわち筋緊張亢進に起因する疾患の治療剤である。

本発明のA型ボツリヌス毒素のM体は、優れた神経筋伝達阻害活性および高い治療指数を有し、また、抗体の産生を誘導しにくく、繰り返し投与しても効果減15 弱が少ないので、斜視、眼瞼痙攣、顔面痙攣、痙性斜頸、脳卒中後の麻痺、小児脳性麻痺、痙性発声障害、片頭痛などの頭痛、腰痛などの慢性的な疼痛、肩こり、パーキンソン病や多発性硬化症などの発症時に起こる筋弛緩不全、筋膜痛症候群、咀嚼筋痙攣、慢性裂肛、尿失禁、歯ぎしり、顔面ミオキミア、チック、局所性ジストニー、皺などの筋緊張亢進に起因する疾患の治療剤として有用である。20 皺としては、例えば顔面筋の収縮によって生じる眉間の皺、目尻の皺、鼻根部の皺、おとがい部の皺などの顔面の皺が挙げられる。

詳細は薬理試験の項で述べるが、筋張力試験を実施することにより、A型ボツリヌス毒素のM体（HA陰性体）の神経伝達阻害活性を評価した。この筋張力試験ではマウスの横隔膜・横隔神経標本を用い、比較対照薬物としてA型ボツリヌ25 斯毒素のL体およびLL体の混合物を用いた。また、マウス後肢握力試験を実施することにより、A型ボツリヌス毒素のM体（HA陰性体）の治療指数（TD<sub>20</sub>／ED<sub>50</sub>）を評価した（なお、ED<sub>50</sub>は50%有効量を、また、TD<sub>20</sub>は20%毒性量を表わす。）。さらに抗体価測定試験によりA型ボツリヌス毒素のM体の抗原

性を評価した。これらの後肢握力試験及び抗体価測定試験ではマウスを用い、比較対照薬物としてA型ボツリヌス毒素のL体およびLL体の混合物および市販品であるBOTOX（登録商標）を用いた。これらの比較対照薬物を用いた試験は同一モル比で実施するのが標準的であるが、L体およびLL体の混合物の分子量を特定するのが困難であったので、毒素の生物活性（力価）を基準とした。即ち、毒素の力価はi. p. LD<sub>50</sub>値（腹腔内投与における50%致死量）で表すことができ、そのi. p. LD<sub>50</sub>値が同一となる量で試験した。

筋張力試験の結果より、M体は、L体およびLL体の混合物と同一力価のものを用いたにもかかわらず、L体およびLL体の混合物に比べて約10倍もの神経伝達阻害活性を発揮することが判明した。同一力価の毒素では、同一の効果を発揮すると予測されるのが通常であるが、本知見はその予測を全く覆すものである。また、後肢握力試験の結果より、A型ボツリヌス毒素のM体の治療指數（TD<sub>20</sub>／ED<sub>50</sub>）は、市販品であるBOTOX（登録商標）の約5倍であることが判明した。また、抗体価測定試験の結果より、A型ボツリヌス毒素のM体の抗原性は、BOTOX（登録商標）よりも低いこと、さらには、A型ボツリヌス毒素のM体は、BOTOX（登録商標）と比べて、繰り返し投与しても効果減弱が少ないことが判明した。これらの結果から、A型ボツリヌス毒素のM体を用いれば、より高い治療効果が得られると同時に、全身倦怠感などの副作用の発生を効果的に抑制することが可能となると考えられる。

本発明のA型ボツリヌス毒素のM体は、*Clostridium botulinum* type Aのうち、7I03-H、7I05-H、Chiba-H、Kyoto-F、804-1HなどのHA陽性体を産生しない菌株を用いて培養すれば、A型ボツリヌス毒素のM体だけを産生することができる、L体およびLL体を分離する手間を省くことができる。また、M体、L体およびLL体を含むボツリヌス毒素液をイオン交換カラム、ゲルろ過カラムに通すことにより、血球凝集活性を示さないM体だけをこれらの混合物から単離することもできる。

A型ボツリヌス毒素のM体は、血球凝集活性を示さず（HA陰性）、その分子量は200000～400000の範囲にある。これに対して、A型ボツリヌス

毒素のL体およびLL体は、血球凝集活性を示し（HA陽性）、その分子量は50000以上である。したがって、A型ボツリヌス毒素のM体は、そのL体およびLL体と明確に区別できる。

本発明のA型ボツリヌス毒素のM体の投与量は、対象疾患により適宜選択する  
5 ことができ特に制限されないが、毒素による副作用に配慮すると、治療一回あたり0.01～500単位／部位であることが好ましく、より好ましくは0.5～300単位／部位である。

本発明の筋緊張亢進に起因する疾患の治療剤は、ボツリヌス毒素の作用部位である筋肉に投与することが好ましい。その投与剤型は、主に注射剤であり、汎用  
10 されている技術を用いて製剤化することができる。

本発明の注射剤は、塩化ナトリウムなどの浸透圧調整剤、リン酸ナトリウムなどの緩衝剤等の添加剤を加えて、調製することができる。

本発明の注射剤のpHは4.0～7.5に設定することが好ましく、また、浸透圧比を1.0付近に設定することが好ましい。

15 本発明の筋緊張亢進に起因する疾患の治療剤は、通常行なわれている筋肉内注射を用いればよい。

#### 図面の簡単な説明

20 図1は、被験液、比較液を用いたときのマウス致死活性と神経筋伝達阻害活性の関係を示すグラフである。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下に製造例、薬理試験および製剤例を示すが、これらの実施例は、本発明をよりよく理解するためのものであり、本発明の範囲を限定するものではない。

##### 25 1. 試験用毒素の製造

A型ボツリヌス毒素の試験用毒素は、阪口の方法（Sakaguchi, G. (1983) Clostridium botulinum toxins. Pharmac Ther. 19, 165-94）に一部変更を加えて製造した。

## (1) 製造例 1 (M体毒素の製造)

凍結保存されている *Clostridium botulinum* type A 7103H株（「M体毒素」の產生株）の芽胞菌液を前培養培地（Cooked Meat 培地）に接種して、30℃で2日間培養した。この前培養培地をペプトン-酵母抽出物-グルコース培地（PYG 培地）  
5 に接種して、30℃で3日間培養した。

つぎに、この培養液に3N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を加えて酸沈殿を行った後、pHを3.5に調整して一晩室温で静置した。翌日、遠心分離（9200×g、20分、4℃）して得られた沈殿に0.2M-リン酸緩衝液（pH6.0）を加えて溶解させた。

溶解液のpHを6.0に調整し、37℃で1時間混和し毒素を抽出した。抽出液を遠心  
10 分離（9200×g、20分、4℃）し、その上清を採取し、2%のプロタミンを含有する0.2M-リン酸緩衝液（pH6.0）を加えて沈殿を得た。これを遠心分離（9200×g、1  
5分、4℃）し、上清を得た。ついで、この上清に飽和硫安（390g/L）が60%（w/v  
）となるように加え、4℃で一晩静置して塩析を行った。翌日、遠心分離（9200×g  
、15分、4℃）を行い、沈殿を0.05M-酢酸緩衝液（pH4.2、0.2M-NaCl）に溶解させ  
15 、その溶液を透析膜に入れ、0.05M-酢酸緩衝液（pH4.2、0.2M-NaCl）で一晩透析  
した。透析終了後遠心分離（13700×g、15分、4℃）して、その上清を0.05M-酢酸緩  
衝液（pH4.2、0.2M-NaCl）で平衡化したイオン交換カラム〔SP-Sepharose Fast F  
low（アマシャム社）〕に供した。最終的に0.05M-酢酸緩衝液（pH4.2、0.7M-NaCl）  
となるようにリニアグラジエントをかけて不純物及び毒素を溶出させた。

20 毒素画分は、フラクションコレクターで採取し、毒力測定、OD値、電気泳動像  
をもとに「M体毒素」として集める部分を決定した。集められたフラクションは  
、限外ろ過（アミコンYM30）を用いて濃縮し、純度を上げるために、この濃縮液  
を0.05M 酢酸緩衝液（pH6.0、0.2M-NaCl）で平衡化したゲルろ過カラム〔Sephade  
x G-200（ファルマシア社）〕に通して、毒素フラクションを集め、限外ろ過（ア  
25 ミコンYM30）を用いて濃縮し、薬理試験用のA型ボツリヌス毒素である「M体毒  
素」の原液（蛋白質濃度1.78mg/ml、生物活性 $2.0 \times 10^7$ i. p. LD<sub>50</sub>/ml）を得た。なお  
、生物活性（力価）は、マウスへ腹腔内投与後の50%死亡率（i. p. LD<sub>50</sub>）を指標と  
するものである。

## (2) 製造例 2 (L 体毒素及びL L 体毒素の混合物の製造)

*Clostridium botulinum* type A 7I03H株の代わりに*Clostridium botulinum* type A 62A株（「M 体毒素、L 体毒素およびL L 体毒素の混合物」の产生株）を用いて、製造例 1 と同様の操作を行って、薬理試験用のA型ボツリヌス毒素である「L 体毒素及びL L 体毒素の混合物」の原液（蛋白質濃度1.99 mg/ml, 生物活性 $1.3 \times 10^7$  i. p. LD<sub>50</sub>/ml）を得た。なお、毒素画分は、フラクションコレクターで採取し、毒力測定、OD値、電気泳動像をもとに「L 体毒素及びL L 体毒素の混合物」として集める部分を決定した。

### 2. 薬理試験

#### 10 (1) マウス横隔膜・横隔神経標本の筋張力試験に基づく神経筋伝達阻害活性の比較

「M 体毒素」および「L 体毒素及びL L 体毒素の混合物」について、薬理活性を比較するために、マウス（系統：ddY、性別：雄性）の横隔膜・横隔神経標本を用いた筋張力試験を実施した。

##### 15 (被験液の調製)

製造例 1 のM 体毒素を0.02%ウシ血清アルブミンを含む20mM-トリス塩酸塩緩衝液（pH7.4、150mM-NaCl）で希釈することによって、被験液（ $3.4 \times 10^5$  i. p. LD<sub>50</sub>/ml）を調製した。

##### (比較液の調製)

#### 20 製造例 2 のL 体毒素及びL L 体毒素の混合物を0.02%ウシ血清アルブミンを含む20mM-トリス塩酸塩緩衝液（pH7.4、150mM-NaCl）で希釈することによって、比較液（ $5.5 \times 10^5$ i. p. LD<sub>50</sub>/ml）を調製した。

##### (測定方法)

マウスにペントバルビタール（50mg/kg）を腹腔内投与し、安樂死させた後、胸郭を開いて、左右の横隔神経を胸腺の高さで結紮した。左右の横隔神経を横隔膜に至るまで周囲の結合織から丁寧に剥離した後、腹腔側にも切開を加えて、横隔膜と第十二肋骨を一体として横隔神経が付着したままの状態で摘出した。摘出した横隔膜・横隔神経標本を37°Cに保温した水槽中で半切し、各々の横隔膜半片を

第十二肋骨に通した綱糸で組織支持装置に固定した。

つぎに、横隔神経を白金電極輪に通した後、横隔膜標本を37°Cに保温した組織浴槽に移した。一端を横隔膜中心腱に結紮した綱糸の他端を等尺張力トランスデューサーに接続して、横隔膜・横隔神経標本をKrebs液中に懸垂した。白金電極輪  
5 から電圧1Vで持続時間10msecの矩形波を0.25Hzの頻度で横隔神経に加え、神経に対する電気刺激で誘発される横隔膜の収縮張力を張力アンプで増幅し、経時的にペンレコーダーに記録した。横隔膜・横隔神経標本に約4gの安静時負荷をかけ、1  
5~20分毎に組織浴槽中のKrebs液を交換しながら誘発張力および基線が安定するまで1~2時間無処理のまま観察した。

10 基線および張力が安定していることを確認した後、被験液および比較液をそれぞれ組織浴槽のKrebs液に添加し、誘発張力の毒素による減衰を記録した。実験終了後に、各々の横隔膜・横隔神経標本について張力を解析した。毒素作用による張力の減衰の指標として、毒素添加時から、誘発張力が毒素処理直前の誘発張力に対して $1/e$ にまで減衰する時間、即ち、経時的に記録した収縮張力をプロットし  
15 、近似曲線を求ることによって、横隔神経・横隔膜標本の収縮張力が、毒素処理前の収縮張力の $1/e$ まで減弱するのに要する毒素処理時間( $\tau$ )を求め、これを神経筋伝達阻害活性の指標とした(なお、神経筋伝達阻害活性は、 $\tau$ 値が小さいほどが大きくなる。)。これらの結果から、図1に、被験液、比較液を用いたときのマウス致死作用と神経筋伝達阻害活性の関係を示し、また、表1に、同一マウス致死作用量において被験液の神経筋伝達阻害活性を1とした場合の比較液の阻害活性を示す。なお、図1中の被験液の各プロットは4~5例の平均値を、また  
20 、比較液の各プロットは2~3例の平均値を示す。

表1

神経筋伝達阻害活性	
被験液	1.00
比較液	0.10

25 (結果)

図1および表1より、M体毒素の神経筋伝達阻害活性は、L体毒素及びLL体

毒素の混合物の約10倍である。

## (2) マウス後肢握力試験に基づく治療指数の比較

「M体毒素」、「L体毒素及びLL体毒素の混合物」および「BOTOX（登録商標）（アラガン社製）」について、薬効（ED<sub>50</sub>：50%有効量）および毒性（TD<sub>20</sub>：20%毒性量）から治療指数（TD<sub>20</sub>／ED<sub>50</sub>）を比較するために、マウス（系統：ddY、性別：雄性）の後肢握力試験を実施した。

### (i) 薬効（ED<sub>50</sub>）の検討

#### （被験液の調製）

製造例1のM体毒素を0.1%ヒト血清アルブミンを含む生理食塩液で希釈することによって、濃度の異なる5種類の被験液（1.2、4、12、40および120 i.p. LD<sub>50</sub>/ml）を調製した。

#### （比較液Aの調製）

製造例2のL体毒素及びLL体毒素の混合物を0.1%ヒト血清アルブミンを含む生理食塩液で希釈することによって、被験液の場合と同様に濃度の異なる5種類の被験液（1.2、4、12、40および120 i.p. LD<sub>50</sub>/ml）を調製した。

#### （比較液Bの調製）

BOTOX（登録商標）を0.1%ヒト血清アルブミンを含む生理食塩液で希釈することによって、被験液の場合と同様に濃度の異なる5種類の被験液（1.2、4、12、40および120 i.p. LD<sub>50</sub>/ml）を調製した。

### （測定方法）

マウスの右後肢腓腹筋に、溶媒（0.1%ヒト血清アルブミンを含む生理食塩液）、被験液、比較液Aおよび比較液Bをそれぞれ250 μl/kgの投与量で投与し（被験液、比較液Aおよび比較液Bのそれぞれの毒素の投与用量は0.3、1、3、10および30 i.p. LD<sub>50</sub>/kgとなる）、投与6時間後、さらに、投与1日、2日、3日、7日、14日および21日後に右後肢の握力を小動物握力測定装置（grip strength meter）を用いて測定した（一群あたり10例）。各測定時間における溶媒投与群の握力を100としたときのそれぞれの毒素投与後の握力を求め、各投与群の握力低下が最大になる時点での値を用いて、被験液、比較液Aおよび比較液Bの

ED<sub>50</sub>値を算出した（表2）。

(ii) 毒性 (TD<sub>20</sub>) の検討

（被験液の調製）

5 製造例1のM体毒素を0.1%ヒト血清アルブミンを含む生理食塩液で希釈することによって、濃度の異なる4種類の被験液（20、50、100および150 i. p. LD<sub>50</sub>/ml）を調製した。

（比較液Aの調製）

10 製造例2のL体毒素及びLL体毒素の混合物を0.1%ヒト血清アルブミンを含む生理食塩液で希釈することによって、被験液の場合と同様に濃度の異なる4種類の被験液（20、50、100および150 i. p. LD<sub>50</sub>/ml）を調製した。

（比較液Bの調製）

15 BOTOX（登録商標）を0.1%ヒト血清アルブミンを含む生理食塩液で希釈することによって、被験液の場合と同様に濃度の異なる4種類の被験液（20、50、100および150 i. p. LD<sub>50</sub>/ml）を調製した。

15 (測定方法)

マウスの右後肢大腿四頭筋に、溶媒、被験液、比較液Aおよび比較液Bをそれぞれ500  $\mu$ l/kgの投与量で投与し（被験液、比較液Aおよび比較液Bのそれぞれの毒素の投与用量は10、25、50および75 i. p. LD<sub>50</sub>/kgとなる）、投与1日、2日、3日、7日および14日後に左後肢の握力をgrip strength meterを用いて測定した（一群あたり6～10例）。この方法は、投与部位である右大腿四頭筋から漏れ出した毒素が、他の筋肉である左後肢筋肉で筋弛緩作用を示す程度を測定するものである。各測定時間における溶媒投与群の握力を100としたときのそれぞれの毒素投与後の握力を求め、各投与群の握力低下が最大になる時点での値を用いて、被験液、比較液Aおよび比較液BのTD<sub>20</sub>値を算出した（表2）。

25

(iii) 治療指数 (TD<sub>20</sub> / ED<sub>50</sub>)

被験液、比較液Aおよび比較液Bのそれぞれに対して、薬効発現のED<sub>50</sub>値に対する毒性発現のTD<sub>20</sub>値の比を求め、この比を治療指数とした。治療指数は、T

$D_{20}/ED_{50}$ として示され、治療指数が大きいほど薬効を示す用量と毒性を示す用量の乖離幅が大きくなり、結局、治療指数が大きい薬物ほど薬物としての有用性が高くなることを意味する。これらの結果を表2に示す。

表2

	ED <sub>50</sub> (i. p. LD <sub>50</sub> /kg)	TD <sub>20</sub> (i. p. LD <sub>50</sub> /kg)	治療指数
被験液	0.57	37.3	65.4
比較液A	0.88	17.0	19.3
比較液B	1.27	16.2	12.8

5

## (結果)

表2から明らかなように、M体毒素のED<sub>50</sub>値は、L体毒素及びLL体毒素の混合物およびBOTOX（登録商標）よりも小さいので、M体毒素はL体毒素及びLL体毒素の混合物およびBOTOX（登録商標）よりも薬効に優れ、また、M 10 体毒素のTD<sub>20</sub>値は、L体毒素及びLL体毒素の混合物およびBOTOX（登録商標）よりも2倍以上も大きいので、M体毒素はL体毒素及びLL体毒素の混合物およびBOTOX（登録商標）よりも毒性がはるかに低い。M体毒素（被験液）の治療指数は、L体毒素及びLL体毒素の混合物（比較液A）の3.4倍、BOTOX（登録商標）（比較液B）の5.1倍である。

## 15 (3) 抗体価測定試験に基づく抗原性の比較

「M体毒素」、「L体毒素及びLL体毒素の混合物」および「BOTOX（登録商標）（アラガン社製）」について、繰り返し投与した後に抗体産生が認められるか否かを比較検討した。

## (被験液の調製)

20 製造例1のM体毒素を0.1%ヒト血清アルブミンを含む生理食塩液で希釈することによって、被験液（100 i. p. LD<sub>50</sub>/ml）を調製した。

## (比較液Aの調製)

製造例2のL体毒素及びLL体毒素の混合物を0.1%ヒト血清アルブミンを含む生理食塩液で希釈することによって、被験液の場合と同様に比較液A（100 i. p. L 25 D<sub>50</sub>/ml）を調製した。

## (比較液Bの調製)

BOTOX（登録商標）を0.1%ヒト血清アルブミンを含む生理食塩液で希釈することによって、被験液の場合と同様に比較液B（100 i. p. LD<sub>50</sub>/ml）を調製した。

## 5 (測定方法)

マウスの右後肢大体四頭筋に、溶媒（0.1%ヒト血清アルブミンを含む生理食塩液）、被験液、比較液Aおよび比較液Bをそれぞれ500  $\mu$ l/kgの投与量（被験液、比較液Aおよび比較液Bのそれぞれの毒素の投与用量は25 i. p. LD<sub>50</sub>/kgとなる）を3週間に1回の割合で計3回投与した。3回目の投与を行ってから14日もしくは15日後にマウスから血漿を採取し（一群あたり13～19例）、毒素投与前に眼窩静脈より採取しておいた血漿とあわせて、ELISA法により抗体価を測定した。毒素投与前に採取した血漿に対する毒素投与後に採取した血漿の吸光度比が1.0以上であったマウスに抗体が產生していたとみなし、抗体を產生したマウス数の割合を求めた（表3）。

15

表3

抗体を產生したマウスの割合 (%)	
被験液	16
比較液A	29
比較液B	31

## (結果)

表3に示すように、M体毒素投与群での抗体を產生したマウスの割合は、L体毒素及びLL体毒素の混合物を投与した群あるいはBOTOX（登録商標）を投与した群での割合のおよそ半分であったことから、M体毒素の抗原性は、L体毒素、LL体毒素あるいはBOTOX（登録商標）に含まれる毒素の抗原性に比べ低い。

## (4) 繰り返し投与による効果減弱率の比較

マウス後肢握力試験において、「M体毒素」、「L体毒素及びLL体毒素の混合物」および「BOTOX（登録商標）（アラガン社製）」を繰り返し投与することにより、その効果が減弱するか否かを比較検討した。

## (被験液の調製)

製造例 1 の M 体毒素を 0.1% ヒト血清アルブミンを含む生理食塩液で希釈することによって被験液 (2 i. p. LD<sub>50</sub>/ml) を調製した。

## (比較液 A の調製)

5 製造例 2 の L 体毒素及び LL 体毒素の混合物を 0.1% ヒト血清アルブミンを含む生理食塩液で希釈することによって、被験液の場合と同様に比較液 A (2 i. p. LD<sub>50</sub>/ml) を調製した。

## (比較液 B の調製)

10 BOTOX (登録商標) を 0.1% ヒト血清アルブミンを含む生理食塩液で希釈することによって、被験液の場合と同様に比較液 B (2 i. p. LD<sub>50</sub>/ml) を調製した。

## (測定方法)

マウスの右後肢腓腹筋に、溶媒 (0.1% ヒト血清アルブミンを含む生理食塩液) 、被験液、比較液 A および比較液 B をそれぞれ 7.5  $\mu$ l の投与量で投与し (被験液、比較液 A および比較液 B のそれぞれの毒素の投与用量は 0.015 i. p. LD<sub>50</sub> となる) 、投与 1 日、 2 日および 3 日後に右後肢の握力を小動物握力測定装置 (grip strength meter) を用いて測定した。1 回目の投与後 28 日目に 2 回目の投与を行い (投与法・投与用量は 1 回目と同じ) 、 1 回目と同様に投与 1 日、 2 日および 3 日後に右後肢の握力を測定した (一群あたり 11 または 12 例) 。各測定時間における溶媒投与群の握力を 100 としたときのそれぞれの毒素投与後の握力を求め、1 回目投与時および 2 回目投与時のそれぞれについて、各マウスの 3 測定日分の総和 (投与後 1 + 2 + 3 日) を算出した後、それぞれの総和について 1 回目投与時の値から 2 回目投与時の差の平均値を求めることにより、効果減弱率を算出した (表 4) 。なお、この値が大きいほど、2 回目投与時に効果がより減弱していることを示す。

25

表 4

	効果減弱率 (%)
被験液	5
比較液 A	48
比較液 B	26

## (結果)

表4から明らかなように、M体毒素の2回目投与時の効果減弱率に比べて、L体毒素及びLL体毒素の混合物の効果減弱率は約10倍、また、BOTOX（登録商標）の効果減弱度は約5倍の値であった。これらの結果から、M体毒素はL体毒素及びLL体毒素やBOTOX（登録商標）に比べて、繰り返し投与したときに効果減弱が起こりにくい事は明らかである。

## 3. 製剤例

## 注射剤

本発明の注射剤の一般的な製剤例を以下に示す。

## 10 処方1 (100mL中)

A型ボツリヌス毒素のM体	1000単位
ヒト血清アルブミン	75mg
生理食塩水	適量

15 産業上の利用可能性

薬理試験の結果から明らかなように、A型ボツリヌス毒素のM体（HA陰性体）は、L体及びLL体（HA陽性体）の混合物よりも優れた神経筋伝達阻害作用を有し、また、L体及びLL体（HA陽性体）の混合物あるいは市販されているBOTOX（登録商標）の3～5倍もの治療指数を有する。さらに、これは、抗体産生を誘導しにくく、繰り返し投与しても効果の減弱が少ないので、斜視、眼瞼痙攣、片側顔面痙攣、痙性斜頸、脳卒中後の麻痺、小児脳性麻痺、痙性発声障害、片頭痛などの頭痛、腰痛などの慢性的な疼痛、肩こり、パーキンソン病や多発性硬化症などの発症時に起こる筋弛緩不全、筋膜痛症候群、咀嚼筋痙攣、慢性裂肛、尿失禁、歯ぎしり、顔面ミオキミア、チック、局所性ジストニー、皺などの筋緊張亢進に起因する疾患の治療剤として特に有用である。

## 請求の範囲

1. A型ボツリヌス毒素のM体（HA陰性体）を有効成分とする神経筋伝達阻害剤。

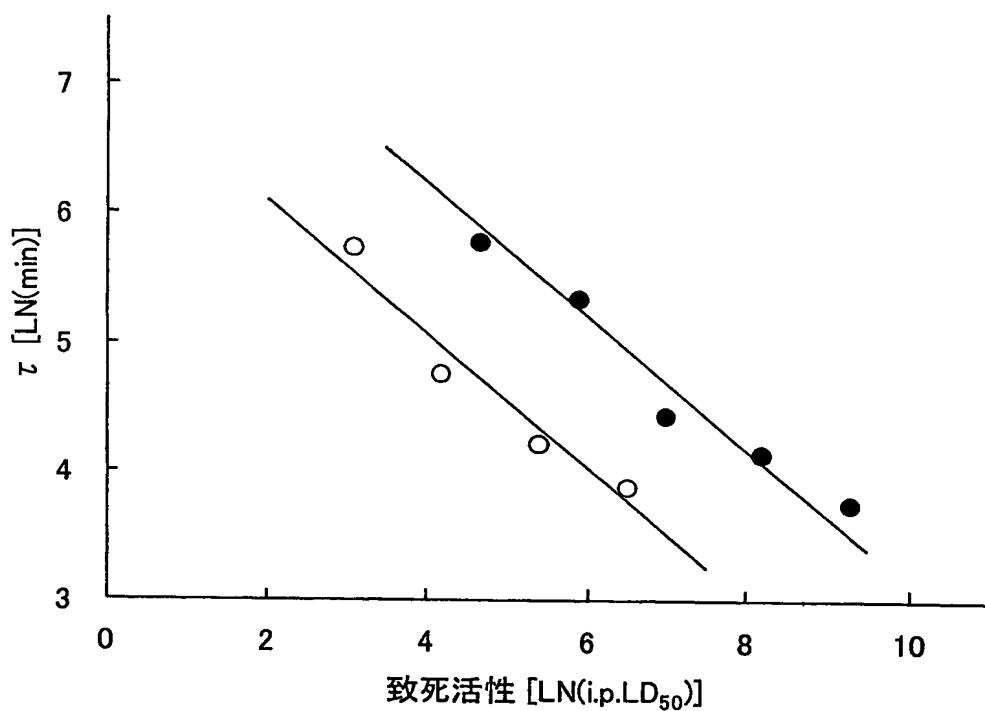
5 2. A型ボツリヌス毒素のM体（HA陰性体）を有効成分とする筋緊張亢進に起因する疾患の治療剤。

3. 筋緊張亢進に起因する疾患が、斜視、眼瞼痙攣、片側顔面痙攣、痙性斜頸、脳卒中後の麻痺、小児脳性麻痺、痙性発声障害、頭痛、腰痛、頸痛、背中痛、肩こり、パーキンソン病若しくは多発性硬化症に伴う筋弛緩不全、筋膜痛症  
10 候群、咀嚼筋痙攣、慢性裂肛、尿失禁、歯ぎしり、顔面ミオキミア、チック、局所性ジストニーまたは皺である請求項2記載の治療剤。

4. A型ボツリヌス毒素のM体の分子量が、200000～400000であることを特徴とする請求項2記載の治療剤。

5. A型ボツリヌス毒素のM体が、*Clostridium botulinum* type A 7I03-H  
15 、*Clostridium botulinum* type A Chiba-Hまたは*Clostridium botulinum* type A Kyoto-Fの菌株から產生されることを特徴とする請求項2記載の治療剤。

6. 剤型が注射剤である請求項2～5のいずれかに記載の治療剤。

**Fig. 1**

○：被験液（M体毒素）

●：比較液（L体毒素及びLL体毒素の混合物）

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/008963

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
Int.Cl<sup>7</sup> A61K38/16, A61P25/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>7</sup> A61K38/16, A61P25/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CA (STN), MEDLINE (STN)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2003-505343 A (Merutsu & Co., GmbH. & Co.), 12 February, 2003 (12.02.03), Full text	1-4, 6
Y	& WO 00/74703 A & DE 19925739 A & EP 1185291 B1 & CN 1354670 A	5
X	WO 96/11699 A (WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION), 25 April, 1996 (25.04.96), Full text	1-4, 6
Y	& US 5512547 A & AU 9527777 A	5

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
24 September, 2004 (24.09.04)

Date of mailing of the international search report  
12 October, 2004 (12.10.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/008963

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Toru KUBOTA et al., Mosaic Type of the Nontoxic-Nonhemagglutinin Component Gene in Closridium botulinum Type A Strain Isolated from Infant Botulism in Japan, Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol.224, pages 843 to 848, 1996	5

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2004/008963

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C17 A61K 38/16, A61P 25/00

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C17 A61K 38/16, A61P 25/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), MEDLINE (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	JP 2003-505343 A (メルツ・ウント・コンパニー ・ゲゼルシャフト・ミト・ペシュレンクテル・ハフツング・ウント ・コンパニー) 2003. 02. 12, 全文 &WO 00/74703 A &DE 19925739 A &EP 1185291 B1 &CN 1354670 A	1-4, 6 5
X Y	WO 96/11699 A (WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION) 1996. 04. 25, 全文 &US 5512547 A &AU 9527777 A	1-4, 6 5
<input checked="" type="checkbox"/>	C欄の続きにも文献が列挙されている。	<input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

24. 09. 2004

国際調査報告の発送日

12.10.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

八原 由美子

4C 9261

電話番号 03-3581-1101 内線 3451

C(続き) .	関連すると認められる文献	関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
Y	Toru Kubota et al., Mosaic Type of the Nontoxic-Nonhemagglutinin Component Gene in Clostridium botulinum Type A Strain Isolated from Infant Botulism in Japan, Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 224, p. 843-848, 1996	5